

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Klára Jílková**

**Vznik, degenerace a detekce pohlavních chromozomů**  
**Origin, degeneration and detection of sex chromosomes**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Král, Dr.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.5. 2011

Podpis

**Poděkování:**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Královi, Dr., za veškerou trpělivost a ochotu se mi věnovat při odborném vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Alexandru Semberovi a rodině za poskytnuté rady a zázemí při vypracovávání mé bakalářské práce.

Vypracování bakalářské práce bylo podpořeno projektem GAČR-ČR č. 206/08/0813.

## Obsah

Abstrakt .....	2
Abstract .....	3
1. Úvod .....	4
2. Vznik a diferenciacie pohlavních chromozomů .....	5
2.1. Suprese rekombinace.....	7
2.2. Degenerace nepárového pohlavního chromozomu .....	8
2.2.1. Mullerova rohatka .....	10
2.2.2. Selekcce na pozadí .....	10
2.2.3. Genetické svezení se .....	12
2.2.4. Transponovatelné elementy.....	12
2.3. Další způsoby vzniku pohlavních chromozomů .....	13
3. Přepnutí mezi různými typy determinace pohlaví.....	16
4. Využití metod in situ hybridizace ke studiu pohlavních chromozomů.....	18
4.1. Základní metodika GISH a CGH pro detekci pohlavních chromozomů .....	20
5. Závěr.....	22
6. Seznam použité literatury .....	23

## Abstrakt

Pohlavní chromozomy jsou většinou odvozeny z páru autozomů a diferencují v důsledku suprese rekombinace. Tento proces vede k postupné degeneraci nepárového pohlavního chromozomu a tato část genomu se stává geneticky inertní. Mezi nejdůležitější mechanismy degenerace alozomu patří Mullerova rohatka, genetické svezení se a selekce na pozadí. Přímý vliv na degeneraci mají transponovatelné elementy a akumulace konstitutivního heterochromatinu. Tyto procesy se podílejí jak na degeneraci Y chromozomu, tak na degeneraci W chromozomu. Existují ale selekční tlaky, které vedou k tomu, že se rychlost degenerace těchto alozomů liší. Rozdíly v degeneraci se vyskytují i mezi alozomy živočichů a rostlin, a to zejména proto, že některé rostliny jsou ve značné fázi svého životního cyklu v haploidním stavu. Mezi jiné způsoby vzniku pohlavních chromozomů patří přestavby mezi autozomy a gonozomy, nondisjunkce a rozpad původních pohlavních chromozomů, vznik z B chromozomů nebo nenáhodná segregace autozomů s pohlavními chromozomy. Další možností evoluce pohlavních chromozomů je tranzice mezi systémy XY/XX a ZW/ZZ popř. tranzice mezi chromozomovým a epigamním určením pohlaví. Je možné, že se přechod mezi systémy XY/XX a ZW/ZZ odehrál i během vzniku savců z plazího předka. Pohlavní chromozomy jsou tedy evolučně velmi dynamické. Zákonitosti jejich evoluce mohou být objasněny také využitím metod molekulární cytogenetiky, např. fluorescenční hybridizace in situ. Tyto metody mohou odhalit např. kryptické pohlavní chromozomy v rané fázi diferenciace. Další možností jejich použití je srovnávání pohlavních chromozomů příbuzných druhů. Tak lze postupně odhalovat, k jakým dějům docházelo v průběhu evoluce pohlavních chromozomů.

## **Abstract**

Sex chromosomes evolved from a pair of autosomes and they are differentiated as a result of suppression of recombination. This process leads to a successive degradation of odd sex chromosome (alosome), which is becoming genetically inert finally or even excluded. Fundamental processes taking part in degeneration of alosome are Muller's ratchet, genetic hitchhiking, background selection, accumulation of transposable elements and constitutive heterochromatin. Indeed, these processes take part in either degeneration of both Y or W chromosomes. Remarkably, these alosomes show different rates of degeneration, most probably due to 1) different structure of male and female gonads as well as 2) different course of gametogenesis in both sexes. Furthermore, rate of alosome degeneration is usually lower in plants because they are haploid during the major part of life cycle. Other mechanisms of sex chromosome evolution involve rearrangements between autosomes and gonosomes, nondisjunctions and fissions of original sex chromosomes, transformation of B chromosomes into sex chromosomes or non-random segregation of autosomes with sex chromosomes. Other phenomenon that appears in sex chromosome evolution is transition between XY/XX and ZW/ZZ systems or transition between chromosomal sex determination and epigamy. Actually, there is a possibility that transition between XY/XX and ZW/ZZ systems have occurred during evolution of mammals from the reptilian ancestor. Thus, sex chromosomes appear to be evolutionarily very dynamic. Sex chromosomes in early phase of their differentiation can be detected by methods of molecular cytogenetics, namely by fluorescence in situ hybridization. Other possibility of application of these methods is to trace sex chromosome evolution of selected taxa.

**Klíčová slova:** CGH, degenerace, genetické svezení se, GISH, Mullerova rohatka, pohlavní chromozomy, selekce na pozadí

**Keywords:** background selection, CGH, degeneration, genetic hitchhiking, GISH, Muller's ratchet, sex chromosomes

## 1. Úvod

Pohlavní rozmnožování je jednou z významných inovací v evoluci organismů. Kombinací genomů se zvyšuje variabilita potomků a tím i jejich přizpůsobivost změnám prostředí.

Evolučně původní formou pohlavního rozmnožování je hermafroditismus. O tom, zda se buňky hermafrodita budou vyvíjet jako samčí či samičí, rozhodují vlivy vnitřního nebo vnějšího prostředí. Pokročilejším typem jsou gonochoristé, u kterých mohou vlivy prostředí také rozhodovat o určení pohlaví. Pohlaví u gonochoristů však může být určeno i syngamně, tedy při oplození vajíčka. Toto určení pohlaví souvisí s existencí pohlavních chromozomů (Sládeček, 1986).

Co se týče pohlavních chromozomů, jedno pohlaví je vždy analogické heterozygotovi (produkuje dva typy pohlavních buněk, které se liší pohlavními chromozomy; heterogametické pohlaví) a druhé recesivnímu homozygotovi (produkuje jen jeden typ pohlavních buněk; homogametické pohlaví). Křížením takových jedinců je zabezpečen přibližně stejný počet samců a samic v populaci. Tento poměr zajišťuje maximální genovou variabilitu a snižuje pravděpodobnost příbuzenského křížení (Nur, 1974).

Existují dva základní typy chromozomového určení pohlaví. Prvním je savčí typ (= typ *Drosophila*), kdy samci jsou heterogametičtí (XY) a samice homogametické (XX). Druhým je ptačí typ (= typ *Abraxas*), kdy samice jsou heterogametické (ZW) a samci homogametičtí (ZZ) (Bull, 1983).

První část práce je zaměřena na vybrané aspekty evoluce pohlavních chromozomů, a to na způsob jejich vzniku, supresi rekombinace mezi pohlavními chromozomy a následnou degeneraci nepárového pohlavního chromozomu. Druhá část je věnována molekulárním metodám detekce pohlavních chromozomů. Jedná se o varianty fluorescenční hybridizace in situ, konkrétně o genomovou hybridizaci in situ (GISH) a komparativní genomovou hybridizaci (CGH).

Problematikou evoluce pohlavních chromozomů se pravděpodobně budu zabývat také ve své diplomové práci. Pomocí metod GISH a CGH se pokusím detekovat pohlavní chromozomy u skupin pavoukovců, u nichž nebyly nalezeny morfologicky diferencované pohlavní chromozomy. Přestože jsou pavoukovci gonochoristé, jen málo skupin této třídy má pohlavní chromozomy diferencované na takové úrovni, že je lze cytologicky detekovat.

## 2. Vznik a diferenciace pohlavních chromozomů

Pohlavní chromozomy se vyvinuly z páru autozomů, které původně nesly gen nebo geny determinující pohlaví (Charlesworth 1996, Rice 1996). Hypotéza, že pohlavní chromozomy byly původně homologní, byla ověřena například u člověka a myši. U nich se prokázalo, že některé geny v nerekombinující části Y chromozomu jsou homologní ke genům vázaným na X chromozomu (Lahn a Page, 1999; Skaletsky et al., 2003; Sandstedt a Tucker, 2004).

Nepárové pohlavní chromozomy neboli alozomy (Y nebo W) jsou u různých rostlin a živočichů v různém stádiu diferenciace. Tento proces začíná, pokud jeden člen páru autozomů získá určitý dominantní faktor, který determinuje pohlaví. Tímto faktorem může být samotná dominantní alela nebo soubor těsně vázaných genů (Rice, 1996).

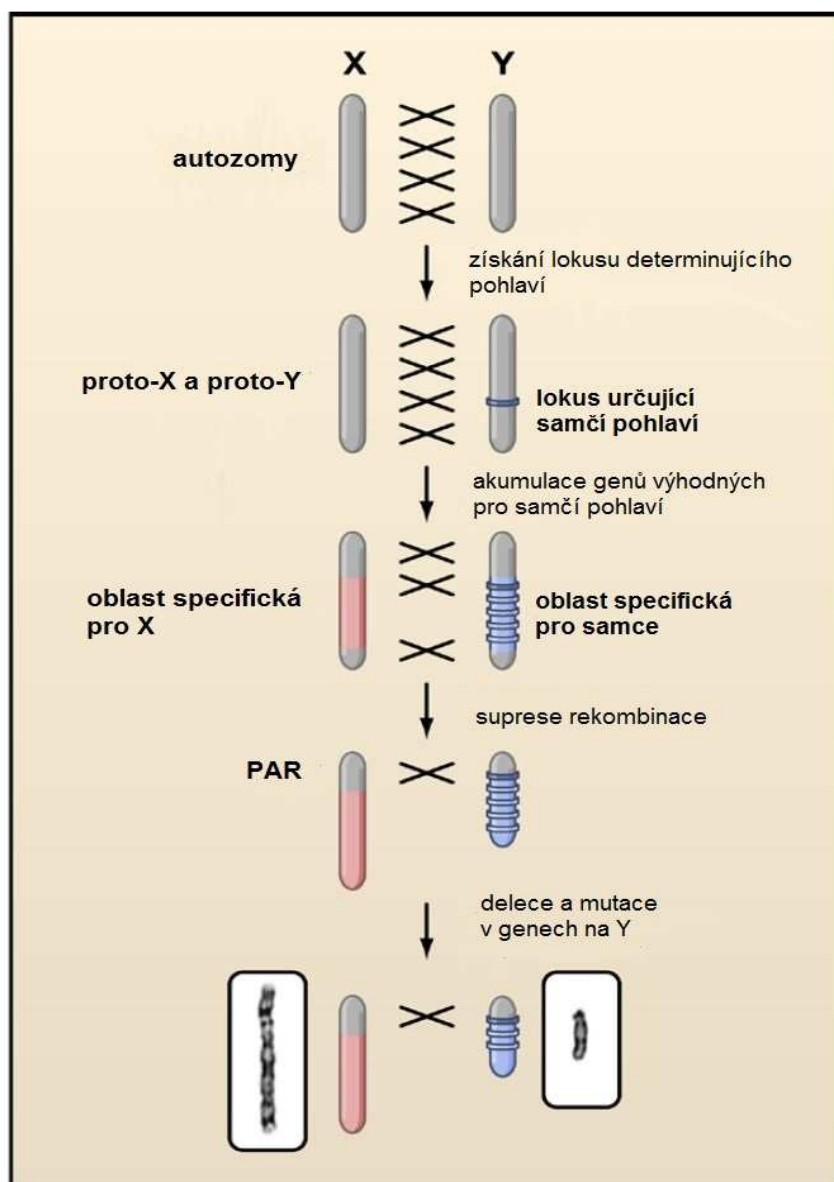
Experimentálně bylo prokázáno, že se v blízkosti takového pohlavního lokusu hromadí alely výhodné pro samce (Rice, 1987b). Podobně se na druhém pohlavním chromozomu mohou hromadit alely výhodné pro samice. Tento mechanismus by se měl uplatňovat jak u samčích, tak i u samičích heterogametií.

U savců je samčím dominantním faktorem gen *SRY* (sex-determining region Y), odvozený od genu *SOX3* (SRY-box 3), který je přítomen na X chromozomu (Stevanovic et al., 1993; Foster a Graves, 1994).

Model vývoje alozomu, který platí pro savce a drozofilu, předpokládá, že alozom byl původně homologní s párovým pohlavním chromozomem. V případě, že každý z pohlavních chromozomů nesl klastér genů výhodných pro jedno pohlaví, bylo výhodné, aby byl tento klastér chráněn před rekombinací. Nepárový pohlavní chromozom tak postupně přestal rekombinovat s párovým pohlavním chromozomem, což vyústilo v jeho diferenciaci a posléze degeneraci (viz obr. 1 a 2) (Charlesworth a Charlesworth, 2000; Bachtrog a Charlesworth, 2002). Posledním krokem v degeneraci alozomu byla jeho exkluze, která vedla ke konverzi systému XY (ZW) na X0 (Z0).

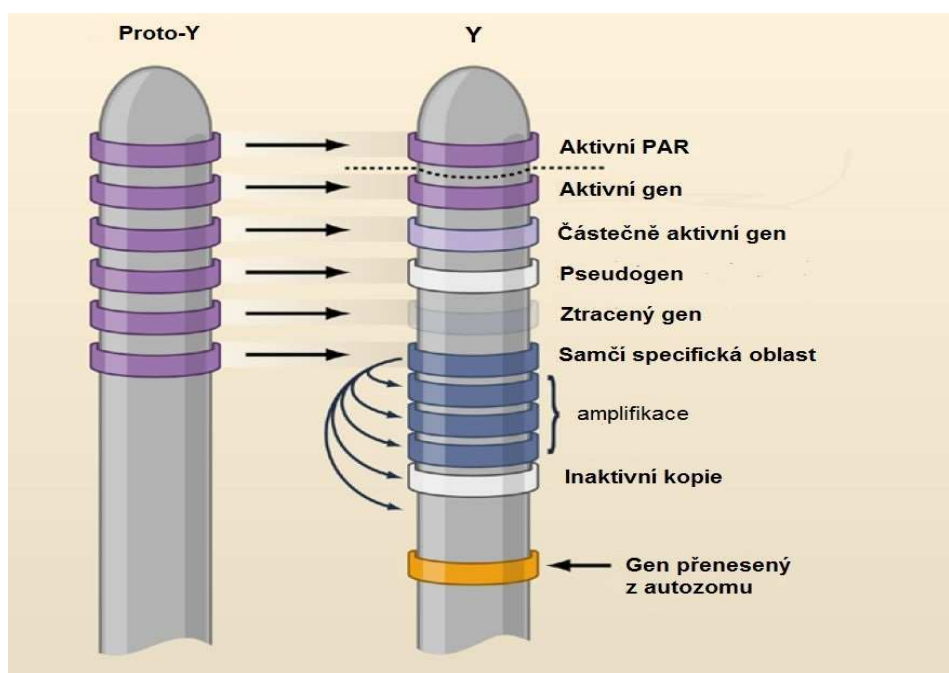
Primitivní pohlavní chromozomy se neliší morfologicky (= homomorfie) a pouze v některých případech je lze detekovat na molekulární úrovni (Traut et al., 1999). S postupující diferenciací pohlavních chromozomů se párový a nepárový pohlavní chromozom odlišují i morfologicky (= heteromorfie). S existencí vysoce diferencovaných pohlavních chromozomů se pojí i některé další jevy. Jedním z nich je inaktivace pohlavních chromozomů v meióze heterogametického pohlaví. Podle jedné z teorií mohou určité pohlavně vázané geny působit jako inhibitory spermatogeneze a proto inaktivace pohlavních chromozomů v meióze slouží k umlčení takových genů (Lifschytz a Lindsley, 1972). Jiná teorie předpokládá, že tento jev





**Obr. 1:** Proces vzniku pohlavních chromozomů z autozomů u savců. Výchozím stavem je pár autozomů, které rekombinují po celé délce (označeno symboly x). Pohlavní chromozomy vznikají poté, co jeden z chromozomů získá lokus, který určuje pohlaví. Akumulace alel specifických pro samce v okolí tohoto lokusu vede k supresi rekombinace v této oblasti. Vytváří se oblast specifická pro chromozom X a na chromozomu Y vzniká oblast specifická pro samce. Ztráta rekombinace vede k degeneraci Y chromozomu, a to ve směru od samčí specifické oblasti k tzv. pseudoautozomové oblasti (PAR). Aktivní geny na alozomu jsou postupně ztraceny s výjimkou genů výhodných pro samce. Upraveno podle Graves (2006).

zabraňuje rekombinacím nehomologických oblastí (Jablonka a Lamb, 1988). Dalším jevem souvisejícím s diferencovanými pohlavními chromozomy je kompenzace dávky genů. V homogametickém pohlaví je na rozdíl od pohlaví heterogametického dvojnásobné množství alel genů vázaných na párový pohlavní chromozom. Proto je jeden ze dvou pohlavních chromozomů v somatických tkáních homogametického pohlaví inaktivován (Lyon, 1961) popř. je u heterogametického pohlaví jediný chromozom X (Z) dvakrát více aktivní než u pohlaví homogametického (Charlesworth, 1978).



**Obr. 2:** Osud genů na Y chromozomu u savců. Některé geny specifické pro samčí pohlaví zůstávají aktivní (tmavě fialově) a jiné částečně aktivní (světle fialově), většina z nich je ale inaktivována (bíle) a deletována. Některé geny mohou získat funkce specifické pro samčí pohlaví (tmavě modře). Mnohé z těchto genů jsou amplifikovány (naznačeno šipkami), některé kopie mohou být inaktivovány a degradovány. Další geny mohou být získány z autozomů (oranžově). Upraveno podle Graves (2006).

## 2.1. Suprese rekombinace

Příčiny a způsob zahájení suprese rekombinace u vznikajících pohlavních chromozomů nejsou dosud zcela jasné. Jak bylo vysvětleno, je třeba chránit před rekombinací geny specifické pro určité pohlaví. V případě, že by i nadále docházelo k rekombinaci, vznikali by pravděpodobně hermafroditi nebo bezpohlavní jedinci (Charlesworth, 1978; Charlesworth, 1996). Suprese rekombinace může být zabezpečena bloky heterochromatinu, strukturními

přestavbami nebo mutacemi v genech účinkujících v meiotickém párování chromozomů a rekombinaci (Ayling a Griffin, 2002). Mezi strukturní přestavby, které vedou k supresi rekombinace u pohlavních chromozomů, se řadí různé typy translokací, rozpad chromozomů, inverze, adice heterochromatinu a delece (King, 1993).

V počáteční fázi suprese rekombinace se z Y chromozomu neztrácejí důležité geny, což bylo dokázáno zvratem pohlaví u ryb *Oryzias latipes*, u kterých jsou pohlavní chromozomy teprve v rané fázi diferenciaci. V laboratorních podmínkách lze tyto ryby během jejich senzitivního období ošetřit androgeny nebo estrogeny a tím získat XX samce, XY samice a dokonce i YY samice, které jsou životaschopné, nevykazují žádné vady a jsou plně plodné (Herpin a Scharl, 2009).

Suprese rekombinace se postupně šíří z oblasti, která je specifická pro určité pohlaví, podél celého chromozomu (Herpin a Scharl, 2009), a způsobuje, že se alozom stává geneticky izolovaným (Ayling a Griffin, 2002).

Pokud jde o stáří alozomu a rozsah suprese rekombinace, neexistuje zde přímá úměra. U některých hadů a ptáků probíhá rekombinace téměř po celé délce ZW páru. Chromozomy Z a W jsou si v tomto případě morfologicky velmi podobné a nesou i podobné geny. Jejich oblasti specifické pro samice jsou proto zřejmě malé. Tyto taxony jsou však velmi staré a proto neplatí, že nediferencované pohlavní chromozomy s malými oblastmi determinujícími pohlaví musí být vždy evolučně mladé (Bergero a Charlesworth, 2009).

## **2.2. Degenerace nepárového pohlavního chromozomu**

Pro degeneraci Y a W chromozomu platí podobná pravidla. Geny vázané na alozomy degenerují z důvodu suprese rekombinace, a tudíž nemohou být opraveny pomocí svého nemutovaného alelického protějšku (Herpin a Scharl, 2009). Alozomy se tak vyvíjejí jako izolované části genomu a kumulují geny, které jsou potřebné pro realizaci fenotypu heterogametického pohlaví (např. geny pro spermatogenezi).

Degenerace nepárových pohlavních chromozomů je charakterizována dvěma hlavními fenomény. Prvním je přeměna euchromatinu na heterochromatin za účasti transponovatelných elementů (kapitola 2.3.4.), druhým je eroze genetického obsahu (Steinemann a Steinemann, 2005). Na této erozi se podílí zejména Mullerova rohatka (kapitola 2.2.1.), selekce na pozadí (kapitola 2.2.2.) a genetické svezení se (kapitola 2.2.3.). Tyto teorie zabývající se degenerací alozomů lze testovat na tzv. neopohlavních chromozomech. Neopohlavní chromozomy jsou pohlavní chromozomy, které vznikly přestavbami mezi autozomy a původními pohlavními chromozomy. Vzhledem k jejich nedávnému vzniku může jejich studium objasnit děje, které

se odehrávaly na počátku vývoje pohlavních chromozomů (Lucchesi, 1978).

Rychlost degenerace nepárových pohlavních chromozomů je ovlivněna vnitřním prostředím gonád a odlišnostmi spermatogeneze a oogeneze. U Y chromozomu se předpokládá, že degeneruje rychleji než W chromozom a to ze dvou důvodů. Za prvé, v samčí gametogenezi dochází k velkému počtu buněčných dělení, takže existuje větší pravděpodobnost, že se zde vyskytne chyba (Ellegren 2002). Druhým důvodem je nepříznivé oxidativní prostředí v samčích gonádách, které způsobuje inhibici reparačních enzymů (Aitken a Graves 2002). V samičí gametogenezi jsou podmínky v těchto ohledech mnohem příznivější, proto W chromozom nepodléhá mutacím v takové míře (Ellegren a Fridolfson, 1997).

Rychlost degenerace alozomů však může být různá i u různých taxonů. Příkladem pomalejší degenerace alozomu jsou rostliny. Chromozomy Y u rostlin jsou v průměru větší než chromozomy Y u savců. U *Silene latifolia* je Y dokonce největším a X druhým největším chromozomem v karyotypu (Kazama a Matsunaga, 2008). Jedním z důvodů, proč chromozom Y v rostlinách nedegeneruje tak rychle jako u živočichů je, že se u rostlin významná část haploidního genomu exprimuje při prorůstání pylovou láčkou a proto je zde velký selekční tlak na kvalitní haploidní genom bez významnějších mutací (Honys a Twell, 2003). Tento selekční tlak by měl působit v mnohem větší míře u mechorostů, které jsou v dominantní části životního cyklu v haploidním stavu. Výzkum u játrovky *Marchantia polymorpha* z velké části tuto teorii potvrdil (Bull, 1978). V haploidním genomu může k degeneraci docházet jen v omezené míře, protože by mohla narušit esenciální geny. Esenciální geny nalezené na Y chromozomu by měly být přítomny i na chromozomu X, protože budou vyžadovány rovněž u samičího pohlaví (Bull, 1983). U *M. polymorpha* byla na Y chromozomu zjištěna přítomnost všech esenciálních genů, avšak celková hustota genů na Y chromozomu je mnohem nižší než se očekávalo (Yamato et al., 2007).

Dalším důvodem, proč je chromozom Y u rostlin tak velký, by mohla být inkorporace chloroplastové DNA do tohoto chromozomu. V jeho nerekombinující části se může tato DNA duplikovat a není přitom odstraněna selekcí (Kejnovsky et al., 2006). Kolonizace alozomu prostřednictvím DNA endosymbiotických organel však není omezena jen na rostliny. Příkladem může být lidský chromozom Y, v němž byla zjištěna přítomnost mitochondriální DNA (Ricchetti et al., 2004).

V následujících kapitolách jsou probrány jednotlivé procesy, které jsou zodpovědné za proces degenerace nepárových pohlavních chromozomů Y a W.

### 2.2.1. Mullerova rohatka

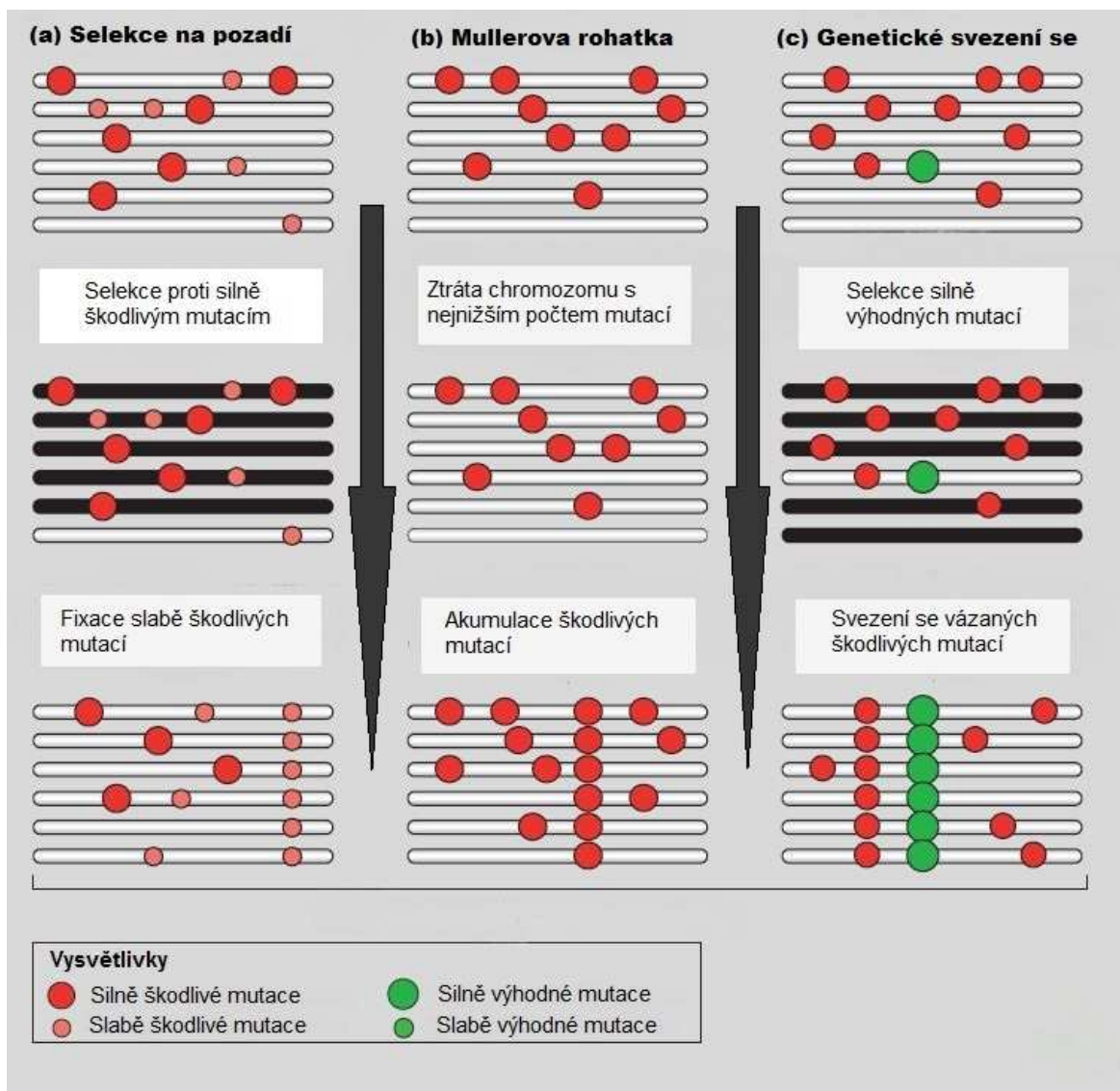
Mullerova rohatka je proces, který působí zejména v počáteční fázi degenerace nepárového pohlavního chromozomu (Bachtrog, 2008). Vede k akumulaci škodlivých mutací v oblastech, ve kterých došlo k supresi rekombinace mezi párovým a nepárovým pohlavním chromozomem (viz obr. 3) (Felsenstein, 1974). Tento model má několik omezení (Charlesworth, 1978). Platí jen pro populaci, která má malou velikost. Alozomy v populaci se dále musí lišit počtem škodlivých mutací. V důsledku malé velikosti populace může snadno dojít ke ztrátě alozomu s nejnižším počtem mutací mechanismem genetického driftu. Nepoškozené alely nemohou být získány z párového pohlavního chromozomu v důsledku suprese rekombinace mezi tímto chromozomem a alozomem, což znamená, že alozom s nejnižším počtem mutací je definitivně ztracen. Výsledkem je postupné zvyšování průměrného počtu mutovaných alel alozomu v populaci (Charlesworth, 1996).

Existují však i případy, kdy Mullerova rohatka není efektivní. Pokud je poměr míry mutací na chromozomu Y a momentální selekční nevýhody velmi malý, Mullerova rohatka nefunguje (Rice, 1987a). Další situací, kdy by Mullerova rohatka nemusela pracovat efektivně, je příliš malý chromozom Y (Maynard Smith, 1978). Parametry použité pro tento teoretický výpočet se však nedají empiricky ověřit (Rice, 1987a). Malé nerekombinující segmenty chromozomu Y, které byly nalezeny u ryb *Poecilia reticulata* a *Oryzias latipes* by téměř jistě podle tohoto výpočtu nemohly degenerovat. Přesto existují důkazy pro jejich částečnou degeneraci (Winge a Ditlevson, 1974; Farr, 1981).

Mullerova rohatka nefunguje jen u pohlavních chromozomů. Tento model byl původně navržen k vysvětlení evolučních výhod rekombinace (Muller, 1964). Mullerova rohatka se tedy může uplatňovat ve všech případech, kdy nedochází k rekombinaci, ať už k tomuto jevu dochází u pohlavních chromozomů (Felsenstein, 1974), v endosymbiotických organelách (Rispe a Moran, 2000) nebo v organismech reprodukcujících se asexuálně (Loewe a Lamatsch, 2008).

### 2.2.2. Selektce na pozadí

Selektce na pozadí (background selection) je v podstatě vedlejším efektem negativní selektce, která může eliminovat nejen škodlivé alely, ale i mírně prospěšné alely, které jsou s nimi ve vazbě (viz obr. 3) (Ellegren, 2011). Podle tohoto modelu může dojít k fixaci výhodné alely pouze tehdy, pokud zvyšuje fitness jedince ve větší míře, než ho snižuje škodlivá alela v její blízkosti (Charlesworth a Charlesworth, 2000). Selektce na pozadí přispívá ke ztrátě genové diverzity. Tento proces se na rozdíl od genetického svezení se uplatňuje v oblastech se



**Obr. 3:** Modely degenerace alozomu. (a) Selektce na pozadí - akumulace slabě škodlivých mutací. (b) Mullerova rohatka - ztráta alozomu s nejnižším počtem škodlivých mutací. (c) Genetické svezení se - fixace škodlivých alel ve vazbě s výhodnými alelami. Modely vysvětlující degeneraci alozomu zahrnují tři důležité složky - mutaci, selekci a genetický drift. Některé mutace se v přírodních populacích vyskytují opakovaně, přičemž mohou mít pozitivní nebo negativní účinky. Přirozená selekce vede k začleňování výhodných a eliminaci škodlivých mutací. V nepřítomnosti rekombinace může mít selekce určitého lokusu velký vliv na lokus, který s ním sousedí. Selektce je v případě alozomu narušena. Škodlivé mutace jsou odstraňovány méně účinně a výhodné mutace jsou zase méně efektivně začleňovány. Upraveno podle Bachtrog (2006).

zvýšenou rekombinací (Kim a Stephan, 2000).

### **2.2.3. Genetické svezení se**

Pod pojmem genetického svezení se (genetic hitchhiking) se rozumí fixace mírně škodlivé alely, a to díky její vazbě s výhodnou alelou (viz. obr. 3) (Charlesworth a Charlesworth, 2000). Charakteristickým znakem tohoto procesu je absence polymorfismů genů v okolí určitého lokusu. Genetické svezení se by mělo převažovat v oblastech se sníženou rekombinací (Kim a Stephan, 2000).

Genetické svezení se může fungovat i samostatně, ale častěji pravděpodobně působí v kombinaci s Mullerovou rohatkou a selekcí na pozadí, přičemž může tyto procesy několika způsoby doplňovat. Za prvé zvyšuje rychlost otáčení rohatky tím, že umožňuje fixaci značně mutovaných variant alozomů (Rice, 1987a). Za druhé usnadňuje fixaci mutací na alozomu (Rice, 1987a). Dominantním procesem je pravděpodobně v situaci, kdy je alozom genově chudý a Mullerova rohatka a selekce na pozadí fungují jen s malou efektivitou (Bachtrog, 2008).

V případech, že genetické svezení se funguje samostatně, snižuje aktivitu genů na Y chromozomu v míře, která závisí na vlivu výhodných mutací na fitness. Pokud bude mít většina výhodných mutací vázaných na Y jen malý vliv na fitness, pak se sveze jen malý počet škodlivých mutací a Y chromozom bude degenerovat mnohem pomaleji, než kdyby genetické svezení se působilo v kombinaci s Mullerovou rohatkou (Rice, 1987a).

### **2.2.4. Transponovatelné elementy**

Dalším důležitým procesem v degeneraci alozomu je akumulace transponovatelných elementů, a to zejména retrotranspozonů. Obohacení alozomu o tyto elementy může odpovídat za přeměnu euchromatinu na konstitutivní heterochromatin (Steinemann a Steinemann, 1998). Tvorba heterochromatinu je jedním z obranných mechanismů proti parazitickým DNA elementům, za které mohou být považovány i transponovatelné elementy. Transponovatelné elementy iniciují vznik heterochromatinu tím, že jejich cytosiny jsou methylovány prostřednictvím mechanismu RNA interference (Henikoff, 2000). Heterochromatin se postupně šíří do oblastí, které jej lemují a epigeneticky umlčuje sousední neporušené nebo již erodované geny (Steinemann a Steinemann, 2005).

Transponovatelné elementy mohou dále poškodit a vyřadit z činnosti geny tím, že do nich inserují nebo ovlivňují jejich genovou expresi. Snížená genová exprese alel genů

vázaných na chromozom Y však může být způsobena také degenerací nebo adaptací (např. v souvislosti s kompenzací dávky) (Bergero a Charlesworth, 2009).

Akumulace transponovatelných elementů podporuje dále chromozomové přestavby, jako jsou například delece (Charlesworth, 1994), což může vést přímo ke zmenšování alozomu. Jsou zde i důkazy, že akumulace transponovatelných elementů způsobujících chromozomové přestavby zodpovídá za ztrátu genů u lidského Y chromozomu (Repping, 2006).

Pokud se transponovatelné elementy akumulují ve vysoce degenerovaných alozomech, ve kterých téměř chybějí geny, jedná se ze selekčního hlediska v podstatě o neutrální dej, který nemá žádný vliv na fitness. Pokud se ale transponovatelné elementy akumulují v rané fázi evoluce pohlavních chromozomů, kdy tyto chromozomy obsahují ještě mnoho funkčních genů, přispívají k pozorovaným ztrátám genových funkcí (Bachtrog, 2005).

Předpoklad, že jednou z hlavních sil, způsobujících degeneraci Y chromozomu je postupné umlčování jeho lokusů prostřednictvím akumulace transponovatelných elementů, byl potvrzen při zkoumání mechanismů, kterými jsou inaktivovány geny pro larvální kutikulární proteiny (Lcp1-4) na chromozomu neo-Y u *Drosophila miranda*. Geny Lcp 1-4 z chromozomu neo-X jsou exprimovány na rozdíl od těch, které leží na neo-Y chromozomu. V blízkosti genů Lcp 1-4 na chromozomu neo-Y se akumulují transpozony. Gen Lcp 3 vykazuje jen omezenou aktivitu a geny Lcp 2-4 jsou již zcela neaktivní. U genů Lcp 1 a Lcp 3 bylo dokázáno, že jejich aktivita je přímo ovlivněna retrotranspozony, které jsou vloženy do jejich regulačních oblastí. Pokud se tyto retrotranspozony deletují, alely Lcp 1 a Lcp 3 na chromozomu neo-Y se mohou normálně exprimovat (Steinemann et al., 1993).

Transponovatelné elementy však nemusí působit jen v roli, kdy způsobují degeneraci nepárového pohlavního chromozomu. U mouchy rodu *Megaselia* se pohlavní chromozomy různých populací vyvinuly z různých párů autozomů. Genom těchto much totiž obsahuje specifický transpozon, jehož součástí je gen determinující pohlaví. Toto neobvyklé spojení umožňuje stěhování tohoto genu do různých autozomů (Traut a Willhoeft, 1990).

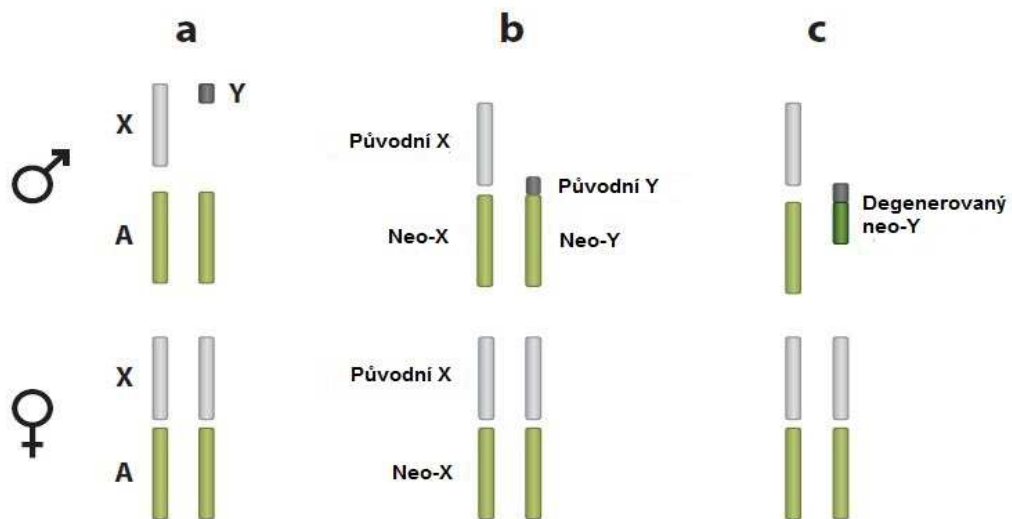
### **2.3. Další způsoby vzniku pohlavních chromozomů**

Jak bylo již zmíněno, jedním ze způsobů vzniku pohlavních chromozomů může být vznik neopohlavních chromozomů translokací mezi původními pohlavními chromozomy a autozomy (viz obr. 4). Neopohlavní chromozomy vznikaly u různých skupin organismů často prostřednictvím Robertsonových translokací (Charlesworth a Charlesworth, 2005). Začleněním neopohlavních chromozomů mohou vznikat různé systémy gonozomů. Tento



proces může vést k regeneraci Y chromozomu v systému X0/XX, a to fúzí autozomu s X chromozomem, přičemž se tato přestavba fixuje v populaci. U samců pokračuje v meióze homolog fúzovaného autozomu v párování s úsekem, který mu odpovídá, a v anafázi prvního meiotického dělení se pohybuje k opačnému pólu buňky. Tím se začíná chovat jako Y chromozom (neo-Y). Protože se vyskytuje jen u samců, působí na něj stejné evoluční faktory jako na původní Y chromozom a dochází opět k jeho degeneraci (Carvalho et al., 2009).

K fúzím pohlavních chromozomů s autozomy však dochází i v XY/XX systému a složitějších systémech, jakož i v systémech se samičí heterogametií. Fúzí Y chromozomu s autozomem vzniká v samcích neo-Y. Partner tohoto fúzovaného autozomu segreguje ke stejnému pólu jako původní chromozom X a chová se tedy jako neopohlavní chromozom X (Kaiser a Bachtrog, 2010).



**Obr. 4:** Evoluce neopohlavních chromozomů u drozofil. (a) Evolučně původní stav (XY/XX). (b) Chromozom Y fúzuje s jedním z autozomů a tím se vytváří chromozom neo-Y, který v samcích segreguje k opačnému pólu než chromozom neo-X. V samičí meióze se neo-X chromozom chová jako autozom. (c) Suprese rekombinace mezi chromozomy X a Y u samců způsobuje, že se chromozom neo-Y geneticky izoluje od neo-X chromozomu. Po nějaké době začne nerekombinující chromozom neo-Y degenerovat podobně jako tomu bylo u původního Y chromozomu. Upraveno podle Kaiser a Bachtrog (2010).

Ukazuje se, že pohlavní chromozomy mohou vznikat i z B chromozomů. To jsou nadpočetné chromozomy, které mají často škodlivý vliv na fitness (Jones a Rees, 1982). Stejně jako ostatní sobecké elementy genomu se snaží udržet prostřednictvím různých mechanismů v populaci. Pokud B chromozom získá schopnost párování a segregace s X

chromozomem, může z něj vzniknout Y chromozom a ze systému X0/XX se tak může stát opět systém XY/XX (Carvalho et al., 2009). Za Y (W) chromozom považujeme tedy takový chromozom, který pravidelně segreguje od X (Z) chromozomu bez ohledu na jeho původ. Příkladem vzniku nepárového pohlavního chromozomu z B chromozomu mohou být *Rhinocola aceris* a *Cacopsylla peregrina* z řádu stejnokřídlých (Nokkala et al., 2000; Nokkala et al. 2003), kde se chromozom B stal Y chromozomem a z původního systému X0/XX vznikl XY/XX, a žába *Leiopelma hochstetteri* se systémem 0W/00, kde se B chromozom stal W chromozomem (Sharbel et al., 1998).

Jiný způsob vzniku pohlavních chromozomů je předpokládán u pavouků., Tito pavoukovci jsou charakterističtí vysokou variabilitou, pokud jde o počet pohlavních chromozomů. Původní systém byl pravděpodobně tvořen dvěma chromozomy X u samců ( $X_1X_2$ ) a čtyřmi chromozomy X u samic ( $X_1X_1X_2X_2$ ). Tento systém je dosud u pavouků nejhojnější a označuje se symbolem  $X_1X_20$ , kde 0 znamená absenci alozomu u samců (Hackman, 1948). Jedna z hypotéz předpokládá, že se tento neobvyklý systém mohl vyvinout prostřednictvím nondisjunkce X z původního X0/XX systému a následným rozrůzněním chromozomů  $X_1$  a  $X_2$  (Postiglioni a Brum-Zorrilla, 1981).

Alternativním vysvětlením, jak tento systém u pavouků mohl vzniknout, je rozpad dvouramenného chromozomu X v systému X0 (Patau, 1948). Předpokládá se, že šlo o centrický rozpad, kdy se původní dvouramenný pohlavní chromozom rozdělil v centromere, čímž vznikly dva jednoramenné chromozomy X. U organismů s monocentrickými chromozomy může dojít také k tomu, že jeden z produktů rozpadu neobsahuje centromeru. Ke stabilizaci takového úseku může dojít například tím, že fúzuje s nadpočetným fragmentem, který obsahuje centromeru (White, 1973). V evoluci vznikají pohlavní chromozomy rozpadem velmi často, a to zejména u organismů s holocentrickými chromozomy. Holocentrické chromozomy jsou charakteristické absencí centromery a jejich kinetochor může pokrývat celou délku chromozomu. V případě jejich rozpadu tedy nedochází ke ztrátě žádného fragmentu původního chromozomu (Dernburg, 2001). Všechny fragmenty na sebe váží mikrotubuly dělicího vřeténka a jsou distribuovány do dceřiných buněk. Příklady organismů s holocentrickými chromozomy, u kterých došlo k rozpadu pohlavních chromozomů, jsou ploštice (Schrader, 1947), motýli (Suomalainen, 1969) a škvoři (Webb a White, 1970). Tento způsob vzniku nových pohlavních chromozomů nevede na rozdíl od přestaveb typu translokací ke snižování počtu autozomů (White, 1973).

Nové pohlavní chromozomy mohou vznikat také tím, že v heterogametickém pohlaví začnou některé autozomy nenáhodně segregovat s pohlavními chromozomy. Ukazuje se, že

taková segregace je závislá na velikosti autozomů. Zatímco malé autozomy segregují standardním způsobem, velké autozomy mají tendenci segregovat s párovým pohlavním chromozomem (Schwander a Beukeboom, 2011). Tento pohlavně vázaný přenos některých autozomů může mít přinejmenším dva důležité následky. Za prvé může vést k redukci velikosti genomu (Wang et al., 2010), za druhé může usnadnit šíření pohlavně antagonistických alel, které podporují fitness jen u jednoho pohlaví (Rice a Holland 1997). Přítomnost pohlavně antagonistických alel na některém autozomovém páru může směřovat k selekci mechanismů, které vedou k segregaci některých autozomů s chromozomem X a tím zastírat rozdíl mezi autozomovou dědičností a dědičností vázanou na pohlavní chromozomy. Nenáhodná segregace autozomů s pohlavními chromozomy byla pozorována například u krtonožky *Neocurtilla hexadactyla* (Kubai a Wise, 1981) a háďátka *Caenorhabditis elegans* (Schwander a Beukeboom, 2011).

### 3. Přepnutí mezi různými typy determinace pohlaví

Savčí XY/XX a ptačí ZW/ZZ systémy vznikly z autozomů společného předka, který měl pravděpodobně teplotně závislou pohlavní determinaci (Ezaz et al., 2006). Savčí XY a ptačí ZW chromozomy jsou si zdánlivě podobné. Ve většině případů je jeden partner (X nebo Z) větší a bohatší geny, zatímco druhý (Y nebo W) je malý, téměř bez genů a tvořen z velké části heterochromatinem. Na podobnost mezi savčím X a ptačím Z chromozomem poukázal Ohno již před více jak čtyřiceti lety a předpokládal, že vznikly ze stejných oblastí genomu (Ohno, 1967). Pokročilejšími technikami byla tato teorie postupně vyvrácena. Mapováním genů se nepotvrdilo, že by ptačí chromozom Z byl homologní s lidským chromozomem X (Olsen et al., 1994). Komparativní genomové mapování ukázalo, že X chromozom člověka je homologní se slepičím chromozomem 1 a 4 a ptačí chromozom Z je do značné míry homologní s lidským chromozomem 9 a malými částmi dalších chromozomů (Nanda et al., 2000), což naznačilo, že se savčí XY a ptačí ZW systémy vyvinuly nezávisle na sobě z různých autozomů (Graves, 2002). Geny chromozomů XY a ZW jsou zcela odlišné (Nanda et al., 1999), povrchní podobnost těchto chromozomů je pouze výsledkem působení společných evolučních mechanismů, které vedly k jejich diferenciaci bez ohledu na typ heterogametrie (Ellegren, 2011).

Nelze však vyloučit, že savčí systém XY/XX vznikl z prapůvodního plazího systému ZW/ZZ (Ezaz et al., 2006). I když je zde zásadní rozdíl mezi samčím a samičím heterogametickým systémem, přechody mezi systémy ZW/ZZ a XY/XX se udály několikrát v průběhu vývoje ryb, obojživelníků a plazů, i když zatím není přesně známo, jakým způsobem

k tomu došlo (Marais a Galtier, 2003).

Fylogenetické analýzy typů určení pohlaví u kostnatých ryb prokázaly, že 8 z 26 čeledí zahrnuje druhy se systémem XY/XX i ZW/ZZ, tudíž je pravděpodobné, že u nich v minulosti docházelo k přepínání mezi oběma systémy (Mank et al., 2006). U ryb rodu *Oryzias* byl zjištěn přechod ze systému XY/XX na systém ZW/ZZ, přičemž každý systém je na jiném chromozomovém páru (Takehana et al., 2008). Podobný výzkum u obojživelníků ukázal další příklady přepínání mezi systémy XY/XX a ZW/ZZ (Hillis a Green, 1990).

K přepnutí mezi samčí a samičí heterogametií dochází dvěma způsoby (van Doorn a Kirkpatrick, 2010). První způsob se označuje jako nehomologní tranzice, ke které dochází, pokud je systém XY/XX na jiném páru chromozomů než ZW/ZZ. V tomto případě se z původních pohlavních chromozomů stávají autozomy a z jiných autozomů vznikají nové pohlavní chromozomy. Tato situace je předpokládána u ryb rodů *Tilapia* a *Oryzias*. Homologní tranzicí se rozumí případ, kdy je jedna varianta chromozomu vytěsněna jinou. To může nastat v případě, kdy gen determinující pohlaví má původně na párovém pohlavním chromozomu recesivní alelu, zatímco na alozomu je dominantní alela. Při homologní tranzici dochází k jevu, kdy se recesivní alela na párovém pohlavním chromozomu stává dominantní a alela na alozomu se stává recesivní. Tak vznikne ze systému XY/XX systém ZW/ZZ. Systém, ve kterém jsou chromozomy X, Y, Z a W odvozeny ze stejných chromozomů je znám například u ryby *Xiphophorus maculatus* (Kallman, 1984 in van Doorn a Kirkpatrick, 2010).

Evoluční mechanismy zodpovědné za přechody mezi samčí a samičí heterogametií nebyly prozatím dostatečně objasněny, ale patří mezi ně například pleiotropní efekt genů určujících pohlaví, selekce na poměr pohlaví a meiotický drive. Bylo navrženo několik schémat, které se pokusily tuto problematiku objasnit. Jedním z posledních je model, který předpokládá, že tranzice mohou být řízeny pohlavně antagonistickou selekcí (van Doorn a Kirkpatrick 2010). Jedním z předpokladů je, že mutace vedoucí ke změně chromozomu X na chromozom W bude vázána s alelami, které zvyšují samičí fitness. Nový typ pohlavních chromozomů se tedy bude šířit působením selekce, což povede k přesmyku mezi systémy XY/XX a ZW/ZZ.

K přesmykům nemusí docházet jen mezi samčí a samičí heterogametií. Ukazuje se, že v evoluci je možné i přepínání mezi chromozomově určeným pohlavím a epigamií. K epigamnímu určení pohlaví dochází až po oplození vajíčka a o pohlaví jedince rozhodují v tomto případě vnější nebo vnitřní vlivy prostředí. Toto přepínání je pravděpodobně možné v obou směrech. U některých druhů agam bylo prokázáno, že přešly z původně syngamně determinovaného pohlaví s plně vyvinutými pohlavními chromozomy Z a W na teplotně

determinované pohlaví (Ezaz et al., 2005). Některé druhy plazů s málo diferencovanými pohlavními chromozomy mohou dokonce využívat teplotní nebo syngamní determinaci pohlaví v závislosti na podmínkách prostředí (Sarre et al., 2004).

#### **4. Využití metod in situ hybridizace ke studiu pohlavních chromozomů**

Heteromorfní pohlavní chromozomy lze od sebe odlišit podle morfologických znaků, jako jsou velikost chromozomů, pozice centromery, vzor meiotických chromomer (Traut a Rathjens, 1973), odlišné ultrastruktury pozorovatelné v transmisním elektronovém mikroskopu (Weith a Traut, 1980) nebo odlišné chování v meióze (John, 1990). Homomorfní (morfologicky nerozlišené) pohlavní chromozomy je možno detekovat pomocí různých pohlavně vázaných markerů, jako jsou heterochromatinové bloky (Schmidt et al., 1979), translokace indukované rentgenovým zářením (Ullerich, 1963; Traut et al., 1990; Kawamura a Niino, 1991), pruhovací techniky (Wiberg, 1983; Hägele, 1985) nebo pohlavně specifické mikrosatelity (Jones a Singh, 1985). Konstitutivní heterochromatin je možno odhalit pomocí C-pruhování. Tímto způsobem byly rozpoznány pohlavní chromozomy u mnoha živočichů, zejména ryb (Koehler et al., 1997) a ptáků (Piggozi, 1999). Jiný přístup k detekci homomorfních pohlavních chromozomů představuje využití pohlavního zvratu (Camerino et al., 2006).

Možnosti detekce homomorfních pohlavních chromozomů se podstatně rozšířily zavedením molekulárně cytogenetických technik jako je fluorescenční hybridizace in situ (FISH). Tyto techniky umožňují studium pohlavních chromozomů pomocí specifických markerů na úrovni DNA, kterými mohou být geny specifické pro určité pohlaví (např. gen *SRY* u savců a gen *DMRT1* u ptáků) (Morrish a Sinclair, 2002), bakteriální arteficiální chromozomové klony (BAC) z oblastí určujících pohlaví (Sahara et al., 2003), pohlavně konzervované mikrosatelity (Nanda et al., 1990, Parasnis et al., 1999) a rDNA sondy, které mohou odhalit klastr ribozomálních genů specifický pro jeden z pohlavních chromozomů (Born a Bertollo, 2000). Významnými metodami pro studium homomorfních pohlavních chromozomů jsou dvě varianty FISH, genomová komparativní hybridizace (CGH) a genomová hybridizace in situ (GISH). Ke studiu evoluce pohlavních chromozomů u příbuzných druhů, které se vyvinuly ze společného předka, je vhodná zejména metoda GISH (Sharma a Sharma, 2001).

CGH byla původně navržena jako metoda pro detekci rozdílů mezi genomem normálních a nádorových buněk na cytogenetické úrovni (Kallioniemi et al., 1992). Tato technika byla později přizpůsobena pro studium pohlavních chromozomů, kdy celogenomová

DNA samic a samců je označena rozdílnými fluorochromy. Označené DNA obou pohlaví jsou hybridizovány současně na chromozomovém preparátu. To umožňuje detekovat pohlavní chromozomy a rozpoznávat na vysoké úrovni molekulární rozdíly mezi nimi (Traut et al., 1999). Metodou CGH byly u želvy *Chelodina longicoilis* (Ezaz et al., 2006) a agamy *Pogona vitticeps* (Ezaz et al., 2005) objeveny pohlavní chromozomy. Protože jsou v rané fázi diferenciaci, nemohly být odhaleny jinými cytogenetickými metodami.

Metody CGH i GISH jsou používány nejen k detekci pohlavních chromozomů, ale také (zejména v případě CGH) ke studiu systémů pohlavních chromozomů na molekulární úrovni. Pomáhají objasňovat vznik a vývoj pohlavních chromozomů, a to zejména v případech, kdy je identifikace pohlavních chromozomů obtížná (rozdíly mezi chromozomy jsou nepatrné, chromozomy jsou příliš malé, počet chromozomů je příliš vysoký nebo nefungují pruhovací metody) (Traut et al., 2001).

Příkladem, kdy byla metoda CGH využita ke složitějšímu studiu pohlavních chromozomů, je evoluce pohlavních chromozomů u želv čeledi Chelidae (Martinez et al., 2008). U druhu *Emydura macquarii* bylo v předchozích cytogenetických studiích pouze zjištěno, že je pohlavní determinace podmíněna geneticky (Thompson, 1988). Diferenciace páru pohlavních chromozomů (jedná se o makrochromozomy) byla s jistotou stanovena teprve pomocí CGH a GTG-pruhování (Martinez et al., 2008). Chromozom Y je submetacentrický a je poněkud větší než metacentrický chromozom X. Na kratším raménku chromozomu Y odhalila CGH oblast specifickou pro samce, která se jevila jako heteromorfni i při GTG-pruhování. Překvapivé je, že u blízce příbuzného druhu *Chelodina longicoilis* je určení pohlaví zabezpečeno mikrochromozomy, které však byly odhaleny pouze metodou CGH a nikoliv GTG pruhováním (Ezaz et al., 2006). Proto byly porovnány pohlavní chromozomy těchto dvou želv, jejichž linie divergovaly před méně než 50 miliony lety (Near et al., 2005). Makrochromozom Y *E. macquarii* mohl vzniknout translokací mikrochromozomu Y na konec autozomu. Protože je počet chromozomů u samců a samic *E. macquarii* stejný, musel by být chromozom X ztracen, což se jeví jako nepravděpodobné. Možný je i opačný proces, tedy rozštěpení makrochromozomů X a Y na autozomy a mikrochromozomy. Bohužel chybí údaje z dalších příbuzných skupin. Další možností je, že se systémy *E. macquarii* a *C. longicoilis* vyvinuly nezávisle z různých autozomových párů a zahrnují tedy rozdílné geny určující pohlaví. Tyto hypotézy mohou být testovány pomocí vybraných metod FISH, které umožní posoudit homologii pohlavních chromozomů obou druhů.

#### 4.1. Základní metodika GISH a CGH pro detekci pohlavních chromozomů

Standardní protokol pro detekci pohlavních chromozomů metodami GISH a CGH je velmi podobný. Rozdíl spočívá v tom, že při GISH se používá značená sonda z celogenomové DNA jednoho pohlaví. U metody CGH jsou označeny celogenomové DNA obou pohlaví, každá jiným fluorochromem. Takto připravené sondy se hybridizují s DNA chromozomů na preparátu. Pokud je známo heterogametického pohlaví, stačí často provést experiment jen u něj. Pokud není známo, je nutno vyšetřit obě pohlaví. Níže je popsán standardní protokol CGH podle Trauta et al. (1999) s řadou modifikací.

Prvním krokem je příprava chromozomových preparátů. Tkáň je hypotonizována v roztoku 0,075M KCl, fixována v methanoloctové fixáži (methanol : kys. octová, 3:1) nebo v Carnoyově fixáži (ethanol : chloroform : kys. octová, 6:3:1). Důležité je tkáň suspendovat, což může být provedeno již při hypotonizaci nebo až během fixace. Suspenze buněk je nakapána (dropping) nebo rozetřena (spreading) na čistá podložní skla. Hotové preparáty jsou odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou (70, 80 a 96%) a uchovávány v hlubokomrazícím boxu. U všech procedur FISH se musí dbát na to, aby na chromozomových figurách nebyla vrstva cytoplazmy.

Druhým krokem je izolace DNA pro přípravu sond a kompetitivní DNA. Pro izolaci z většího živočicha nebo z většího množství tkáně je výhodná chloroform/fenol/izoamylalkoholové extrakce (Graham, 1978), která poskytuje vysoké výtěžky velmi kvalitní DNA. Pokud se nejedná o malého živočicha, je výhodné před izolací DNA odstranit střeva, aby nedošlo ke kontaminaci sondy cizí DNA popř. použít část těla, která střeva neobsahuje (Traut et al., 2001). Celogenomovou DNA je možné extrahovat z celého organismu, z jeho části nebo například i z krve. Ta se odebere pomocí injekční stříkačky obsahující fyziologický roztok s EDTA (kys. ethylendiaminotetraoctová). Poté se provede centrifugace, odstraní se supernatant a krevní buňky se použijí pro izolaci DNA (Sarder et al., 1999). Izolaci celogenomové DNA lze provést i chelexovou extrakcí, což je vhodné zvláště v případě, že k dispozici je pouze malé množství výchozího materiálu (Walsh et al., 1991). Dalším způsobem, jak lze izolovat DNA je využití komerčně dostupných kitů. Tento způsob izolace je založen na vysolovací metodě a provádí se podle příložených protokolů (Op den Buijsch et al., 2006).

Třetím krokem je značení sond, které se provádí buď přímo fluorochromem nebo nepřímo vybranými hapteny. Pro přímé značení jsou optimální například fluorescein, rhodamin a cyanin. Jako hapteny pro nepřímé značení se používají biotin, digoxigenin, fluorescein nebo dinitrofenol, které umožňují následnou detekci pomocí imunochemické

reakce. Pro značení sond se může použít např. metoda nick translace nebo PCR s degenerovanými oligonukleotidy (tzv. DOP PCR). Sonda je nakonec vysrážena (precipitována), a to nejprve Na-acetátem a vychlazeným 96% ethanolem a poté 70% ethanolem, který následně odmyvá z DNA Na-acetát. Aby mohla metoda poskytnout objektivní výsledky, musí se obě sondy připravit ve stejném poměru, co se týče množství DNA (obvykle 1 ug). Do směsi se musí přidat kompetitivní DNA, která má za úkol vyvážit repetitivní sekvence, které by při hybridizaci vytvářely nespecifické signály. Jako kompetitor se obvykle používá sonikovaná DNA z homogametického pohlaví, případně DNA z lososích spermií.

Čtvrtým krokem je samotná hybridizace. Nejprve se provádí tzv. stárnutí preparátů ("aging"), při kterém se skla vystaví jednu nebo více hodin zvýšené teplotě (37-60°C), což zvýší přilnavost chromozomů k povrchu sklíčka, takže nejsou během následujících procedur odmyty. Alternativou je ponechání preparátů týden při laboratorní teplotě. Následně se na preparáty aplikuje proteináza, která rozkládá zbytky cytoplazmy na chromozomech a poté RNáza, která zbaví preparát RNA, jež by mohla vázat sondu. Preparáty jsou poté denaturovány v 70% formamidu, který umožňuje denaturaci DNA za nižší teploty. Také sonda je denaturována ve formamidu (100%) a je k ní přidán ještě dextran sulfát, který zvyšuje koncentraci sondy tím, že vyvazuje molekuly vody. Denaturace sondy probíhá obvykle při teplotách 86-95°C po dobu 3 minut. Poté je sonda prudce ochlazená v ledu, aby denaturované řetězce zůstaly separovány. Preparát je ochlazen v 70% ethanolu, což vede ke stejnému efektu, tj. řetězce DNA zůstávají separovány a nedochází k jejich předčasné reasociaci před hybridizací. Poté se skla odvodňují ve standardní ethanolové řadě (70%, 80%, 96% ethanol). Nakonec je sonda aplikována na preparát. Hybridizace se provádí 3 dny ve tmě při teplotě 37°C. Poté se odmyvají nespecifické signály v sériích různých roztoků a na závěr se chromozomy obarví DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol). Na sklo se nanese tzv. montovací médium (Antifade) podporující fluorescenci. Proces zhášení fluorescence zahrnuje reakci molekuly excitované fluorescenční barvy se singletovým kyslíkem. Antifade funguje jako akceptor reaktivních kyslíkových radikálů a tím zabraňuje ztrátě fluorescence (Longin et al., 1993). Nakonec se preparát přikryje krycím sklíčkem, které se orámuje lakem na nehty, což zabraňuje vysychání preparátu.

Preparáty jsou prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů. Pomocí chlazené CCD kamery jsou fotografovány vhodné chromozomové figury. Výsledný obraz je složen a upraven ve vhodném programu (např. Adobe Photoshop).



## 5. Závěr

Pohlavní chromozomy vznikají nejčastěji z autozomů. Pro vznik pohlavních chromozomů je klíčová diferenciace klastru genů, jehož alely mají opačný účinek u obou pohlaví. V takové situaci je výhodná suprese rekombinace v této oblasti. Suprese se většinou šíří podél pohlavních chromozomů. V důsledku tohoto procesu se pohlavní chromozomy diferencují a nepárový pohlavní chromozom (alozom) následně degeneruje. Tento jev je charakterizován kumulací heterochromatinu a erozí genetické aktivity v důsledku Mullerovy rohatky, selekce na pozadí a genetického svezení se. Bylo ukázáno, že poslední tři mechanismy mohou fungovat buď samostatně, nebo se vzájemně doplňují. V degeneraci pohlavních chromozomů však hrají zásadní roli i transponovatelné elementy, což bylo i empiricky dokázáno.

V závěru první části jsou probrány další způsoby, kterými mohou vznikat pohlavní chromozomy. Jedná se především o přestavby mezi autozomy a pohlavními chromozomy, nondisjunkce a rozpad pohlavních chromozomů, vznik z B chromozomů nebo nenáhodnou segregací autozomů s pohlavními chromozomy. Známé jsou i tranzice mezi různými typy determinace pohlaví. Podle jedné z hypotéz vznikl i savčí systém XY/XX ze systému ZW/ZZ. I když tato teorie není všeobecně uznávána, mohla by mít reálný podklad, protože takové přechody byly prokázány u některých jiných skupin organismů.

Ve druhé části je pojednáno o metodách detekce pohlavních chromozomů. Pohlavní chromozomy jsou vysoce dynamické systémy. Objasnění procesů jejich vzniku a diferenciace je zcela zásadní pro pochopení obecných zákonitostí jejich vývoje. V tomto směru mají jistě velký význam cytogenetické techniky s vysokým rozlišením jako je například metoda genomové hybridizace in situ, komparativní genomová hybridizace, přesnější pruhovací metody a mapování genů. Metody GISH a CGH se ukázaly jako vhodné nejen k identifikaci kryptických pohlavních chromozomů, ale i ke studiu evoluce pohlavních chromozomů. Důležitou roli hrají zejména v analýze molekulární evoluce pohlavních chromozomů a v rekonstrukci evoluce pohlavních chromozomů u příbuzných skupin organismů. Tyto metody budou jistě stále více používány k analýze pohlavních chromozomů a budou mít zásadní vliv na prohloubení poznání v této oblasti.

## 6. Seznam použité literatury

- Aitken, R.J., Graves, J.A.M. (2002): The future of sex. *Nature* 415: 963.
- Ayling L.-J., Griffin D.K. (2002): The evolution of sex chromosomes. *Cytogenetic Genome Research* 99: 125-140.
- Bachtrog, D. (2005): Sex chromosome evolution: Molecular aspect of Y chromosome degeneration in *Drosophila*. *Genome Research* 15: 1393-1401.
- Bachtrog, D. (2006): Expression profile of a degenerating neo-Y chromosome in *Drosophila*. *Current Biology* 16: 1694-1699.
- Bachtrog, D. (2008): The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. *Genetics* 179: 1513–1525.
- Bachtrog, D., Charlesworth, B. (2002): Reduced adaptation of a non-recombining neo-Y chromosome. *Nature* 416: 323-326.
- Bergero, R., Charlesworth, D. (2009): The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 94-102.
- Born, G.G., Bertollo, L.A.C. (2000): An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research* 8: 111-118.
- Bull, J.J. (1978): Sex chromosomes in haploid dioecy: A unique contrast to Muller's ratchet theory for diploid dioecy. *The American Naturalist* 112: 245-250.
- Bull J.J. (1983): *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, USA.
- Camerino, G., Parma, P., Radi, O., Valentini, S. (2006): Sex determination and sex reversal. *Current Opinion in Genetics and Development* 16: 289-292.

Carvalho, B.A., Koerich, L.B., Clark, A.G. (2009): Origin and evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. *Trends in Genetics* 25: 433-440.

Dernburg, A.F. (2001): Here, there, and everywhere: Kinetochore function on holocentric chromosomes. *Journal of Cell Biology* 153: 33-38.

Ellegren, H. (2002): Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends in Genetics* 18: 25-28.

Ellegren H. (2011): Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Genetics* 12, 157-166.

Ellegren, H., Fridolfsson A.-K. (1997): Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nature Genetics* 17: 182–184.

Ezaz, T., Quinn, A.E., Miura, I., Sarre, S.D., Georges, A., Graves, J.A.M. (2005): The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research* 13: 763-776.

Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F., Marshall Graves, J.A. (2006): Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* 16: 736-743.

Farr, J. A. (1981): Biased sex ratios in laboratory strains of guppies, *Lebistes reticulata*. *Heredity* 47: 237-248.

Felsenstein J. (1974): The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78, 737-756.

Foster, J.W., Graves, J. A.M. (1994): An *SRY*-related sequence on the marsupial X chromosome: Implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 91: 1927-1931.

Graham, D.E. (1978): The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses. *Analytical Biochemistry* 85: 609-613.

- Graves, J.A.M. (2002): Sex chromosomes and sex determination in weid mammals. Cytogenetics and Genome Research 96: 161-168.
- Graves, J.A.M. (2006): Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. Cell 124: 901-914.
- Hackman, W. (1948): Chromosomen studien an Araneen mit besinderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen. Acta Zoologica Fennica 54: 1-101.
- Hägele, K. (1985): Identification of a polytene chromosome band containing a male sex determiner of *Chironomus thummi thummi*. Chromosoma 91: 167-171.
- Henikoff, S. (2000): Heterochromatin function in complex genomes. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer 1470: 1-8.
- Herpin, A. Schartl, M. (2009): Molecular mechanisms of sex determination and evolution of the Y-chromosome: Insights from the medakafish (*Oryzias latipes*). Molecular and Cellular Endocrinology 306: 51-58.
- Hillis, D.M., Green, D.M. (1990): Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. Journal of Evolutionary Biology 3: 49–64.
- Honys, D., Twell, D. (2003): Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. Plant Physiology. 132: 640-652.
- Charlesworth, B. (1978): Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. Proceedings of National Academy of Science of the USA 75: 5618-5622.
- Charlesworth, B. (1994): The effect of background selection against deleterious mutations on weakly selected, linked variants. Genetical Research. 63: 213-227.
- Charlesworth B. (1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. Current Biology 6: 149-162.

- Charlesworth, B., Charlesworth, D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1563–1572.
- Charlesworth D., Charlesworth, B., Marais, G. (2005): Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95: 118-128.
- Jablonka, E., Lamb, M.J. (1988): Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *Journal of Theoretical Biology* 133: 23-36.
- John B. (1990): Meiosis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, K.W., Singh, L. (1985): Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends in Genetic* 1: 55-56.
- Jones, R.N., Rees H. (1982): B chromosomes. Academic Press: New York.
- Kaiser, V.B., Bachtrog D. (2010): Evolution of sex chromosomes in insects. *Annual Review of Genetics* 44: 91-112.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818–821.
- Kallman, K.D. (1984). Citováno podle van Doorn, G.S., Kirkpatrick, M. (2010): Transitions between male and female heterogamety caused by sex-antagonistic selection. *Genetics* 186, 629–645.
- Kawamura, N., Niino, T. (1991): Identification of the Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica* 83: 121-123.
- Kazama, Y., Matsunaga, S. (2008): The use of repetitive DNA in cytogenetic studies of plant sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 120: 247-254.
- Kejnovsky, E., Kubat, Z., Hobza, R., Lengerova, M., Sato, S., Tabato, S., Fukui, K.,

- Matsunaga, S., Vyskot, B. (2006): Accumulation of chloroplast DNA sequences on the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genetica* 128: 167-175.
- Kim, Y., Stephan, W. (2000): Joint effects of genetic hitchhiking and background selection on neutral variation. *Genetics* 155: 1415-1427.
- King, M., (1993): *Species Evolution. The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Koehler, M.R., Dehm, D., Guttenbach, M., Nanda, I., Haaf, T., Molina, W.F., Galetti, P.M., Schmid, M. (1997): Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chromosome Research* 5: 12–22.
- Kubai, D.F., Wise, D. (1981): Nonrandom chromosome segregation in *Neocurtilla* (*Gryllotalpa*) *hexadactyla*: An ultrastructural study. *Journal of Cell Biology* 88: 281-293.
- Lahn, B. T., Page, D. C. (1999): Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286, 964–967.
- Lifschytz, E., Lindsley, D.L. (1972): The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis (*Drosophila-allocyclus*-chromosome evolution-male sterility dosage compensation). *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 69: 182-186.
- Loewe, L., Lamatsch, D.K. (2008): Quantifying the threat of extinction from Muller's ratchet in the diploid Amazon molly (*Poecilia formosa*). *BMC Evolutionary Biology* 8: 88-108.
- Longin A., Souchier C., Ffrench M., Bryon P. A. (1993): Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: Image analysis and laser confocal microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41: 1833-1840.
- Lucchesi, J.C. (1978): Gene dosage compensation and evolution of sex chromosomes. *Science* 202: 711-716.

Lyon, M. F. (1961): Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.).  
Nature 190, 372 - 373.

Mank, J.E., Promislow, D.E.L., Avise, J.C. (2006): Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. Biological Journal of the Linnean Society 87: 83–93.

Marais, G., Galtier, N. (2003): Sex chromosomes: how X-Y recombination stops. Current Biology 13: 641-643.

Martinez, P.A., Ezaz, T., Valenzuela, N., Georges, A., Graves, J.A.M. (2008): An XX/XY heteromorphic sex chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: A new piece in the puzzle of sex chromosome evolution in turtles. Chromosome Research 16: 815-825.

Maynard Smith, J. (1978): The Evolution of Sex. Cambridge University Press, Cambridge.

Morrish, B. C., Sinclair, A. H. (2002): Vertebrate sex determination: Many means to an end. Reproduction 124: 447-457.

Muller, H. (1964): The relation of recombination to mutational advance. Mutation Research. 1: 2-9.

Nanda, I., Deubelbeiss, C., Guttenbach, M., Epplen, J. T., Schmid, M. (1990): Heterogeneities in the distribution of (GACA)(n) simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. Human Genetics 85:187-194.

Nanda, I., Shan, Z., Scharl, M., Burt, D. W., Koehler, M., Nothwang H.G., Grutzner, F., Paton, I. R., Windsor, D., Dunn, I., Engel, W., Staeheli, P., Mizuno, S., Haaf, T., Schmid, M. (1999): 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9 [2]. Nature Genetics 21: 258-259.

Nanda, I., Zend-Ajus, E., Shan, Z., Grützner, F., Scharl, M., Burt, D.W, Koehler, M., Fowler, V.M., Goodwill, G., Schneider, W.J., Mizuno, S., Dechant, G., Haaf, T., Schmid, M. (2000): Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenetics and Cell Genetetics* 89: 67-78.

Near, T.J., Meylan, P.A., Shaffer, H.B. (2005): Assessing concordance of fossil calibration points in molecular clock studies: an example using turtles. *The American Naturalist* 165: 137-146.

Nokkala, S., Grozeva, S., Kuznetsova, V., Maryanska-Nadachowska, A. (2003): The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst) (Psylloidea, Homoptera). *Genetica* 119: 327-332.

Nokkala, S., Kuznetsova, V., Maryanska-Nadachowska, A. (2000): Achiasmate segregation of a B chromosome from the X chromosome in two species of psyllids (Psylloidea, Homoptera). *Genetica* 108: 181-189.

Nur, U. (1974): The expected changes in the frequency of alleles affecting the sex ratio. *Theoretical Population Biology* 5 : 143-147.

Ohno, S. (1967): Sex chromosome and sex-linked genes. Springer Verlag, Berlin.

Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A., Hammarstrom, S. (1994): Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics* 23: 659-668.

Op den Buijsch, R.A.M., de Vries, J.E., ten Kate, J., Wijnen, P.A.H.M., Rothkrantz-Kos, S., van Diejen-Visser, M.P., Bekers, O. (2006): Comparison of DNA isolation kits to extract DNA from whole blood samples. *Current Genomics* 7: 73-78.



Parasnis, A.S., Ramakrishna, W., Chowdari, K.V., Gupta, V.S., Ranjekar, P.K. (1999): Microsatellite (GATA)(n) reveals sex-specific differences in papaya. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 1047-1052.

Patau K. (1948): X-segregation and heterochromasy in the spider *Aranea reaumuri*. *Heredity* 2: 77-100.

Pigozzi, M.I. (1999): Origin and evolution of the sex chromosomes in birds. *Biocell* 23: 79-95.

Postiglioni, A., Brum-Zorrilla, N. (1981): Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae-Lycosidae). *Genetica* 56: 47-53.

Repping, S., Van Daalen, S.K.M, Brown, L.G, Korver, C.M., Lange, J., Marszalek, J.D., Pyntikova, T., Van Der Veen, F., Skaletsky, H., Page, D.C., Rozen, S. (2006): High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Ychromosomes. *Nature Genetics* 38, 463–467.

Ricchetti, M., Tekaia, F., Dujon, B. (2004): Continued colonization of the human genome by mitochondrial DNA. *PLoS Biology* 2 (9):  
<http://www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0020273>

Rice, W.R. (1987a): Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics* 116: 161-167.

Rice, W.R. (1987b): The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex-chromosomes. *Evolution* 41: 911-914.

Rice, W.R. (1996): Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience* 46: 331-343.

Rice, W.R., Holland, B. (1997): The enemies within: Intergenomic conflict, interlocus contest evolution (ICE), and the intraspecific Red Queen. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41: 1-10.

Rispe, C., Moran, N. A. (2000): Accumulation of Deleterious Mutations in Endosymbionts: Muller's Ratchet with Two Levels of Selection. *The American Naturalist* 156 (4): 425-441.

Sahara, K., Yoshido, A., Kawamura, N., Ohnuma, A., Abe, H., Mita, K., Oshiki, T., Shimada, T., Asano, S.-I., Bando, H., Yasukochi, Y. (2003): W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* 112: 48-55.

Sandstedt, S. A., Tucker, P. K. (2004): Evolutionary strata on the mouse X chromosome correspond to strata on the human X chromosome. *Genome Research* 14: 267-272.

Sarder, M. R. I., Penman, D. J., Myers, J. M., McAndrew, B. J. (1999): Production of fully inbred clonal lines in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Experimental Zoology* 284: 675-685.

Sarre, S. D., Georges, A., Quinn, A. (2004): The ends of a continuum: Genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26: 639-645.

Sharbel, T.F., Green, D.M., Houben, A. (1998): B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41: 14-22.

Sharma, A. K., Sharma, A. (2001): Chromosome painting - Principles, strategies and scope. *Methods in Cell Science* 23: 1-5.

Schmid, M., Olert, J., Klett, C. (1979): Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55.

Schrader, F. (1947): The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the heteroptera and homoptera. *Evolution* 1: 134-142.

Schwander, T., Beukeboom, L.W. (2011): Non-random autosome segregation: A stepping stone for the evolution of sex chromosome complexes?: Sex-biased transmission of autosomes could facilitate the spread of antagonistic alleles, and generate sex-chromosome systems with multiple X or Y chromosomes. *BioEssays* 33: 111-114.

Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P., Cordum, H., Hillier, L., Brown, L., Repping, S., Pyntikova, T., Alli, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.-F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.-P., Waterson, R.H., Rozen, S., Page, D.C. (2003): The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825–837.

Sládeček, F. (1986): Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia, Praha.

Steinemann, M., Steinemann, S. (1998): Enigma of Y chromosome degeneration: Neo-Y and Neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica* 102/103: 409-420.

Steinemann, S., Steinemann, M. (2005): Retroelements: Tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 110 :134-143.

Steinemann, M., Steinemann, S., Lottspeich, F. (1993): How Y chromosomes become genetically inert. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 90: 5737-5741.

Stevanovic, M., Lovell-Badge, R., Collington, J., Goodfellow, P. N. (1993): *SOX3* is an X-linked gene related to *SRY*. *Human Molecular Genetics* 2: 2013-2018.

Suomalainen, E. (1969): On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma* 28: 298-308.

Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (2008): Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. *Chromosome Research* 16: 801-811.

- Thompson, M. B. (1988): Influence of incubation temperature and water potential on sex determination in *Emydura macquarii* (Testudines: Pleurodira). *Herpetologica* 44: 86-90.
- Traut, W., Eickhoff, U., Storch, J.-C. (2001): Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods in Cell Science* 23: 155-161.
- Traut, W., thi Khuong, N., Schneider, S. (1990): Karyotypes of *Megaselia scalaris* (Diptera) wild-type and translocation strains. *Genetica* 83: 77-84.
- Traut, W., Rathjens, B. (1973): The W-chromosome of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera) and the derivation of the sex-chromatin. *Chromosoma* 41: 437-446.
- Traut, W., Sahara, K., Otto, T.D., Marec, F. (1999): Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173-180.
- Traut, W., Wilhoeft, U. (1990): A jumping sex determining factor in the fly *Megaselia scalaris*. *Chromosoma* 99: 407-412.
- Ullerich, F.-H. (1963): Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmung bei einigen Calliphorinen (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma* 14: 45-110.
- van Doorn, G.S., Kirkpatrick, M. (2010): Transitions between male and female heterogamety caused by sex-antagonistic selection. *Genetics* 186, 629–645.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1999): Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.
- Wang, J., Chen., P., Wang, G., Keller, L. (2010): Chromosome size differences may affect meiosis and genome size. *Science* 329: 293.
- Webb, G.C., White, M.J.D. (1970): A new interpretation of the sex determining mechanism of the European earwig, *Forficula auricularia*. *Experientia* 26: 1387-1389.

Weith, A., Traut, W. (1980): Synaptonemal complexes with associated chromatin in a moth, *Ephesia kuehniella* Z. The fine structure of the W chromosomal heterochromatin. *Chromosoma* 78: 275-291.

White, M.J.D. (1973): Animal cytology and evolution, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Wiberg, U.H. (1983): Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*, L). *Cytogenetics and Cell Genetics* 36, 589-588.

Winge, O., Ditlevson, E. (1947): Colour inheritance and sex determination *Lebistes*. *Heredity* 1: 65-83.

Yamato, K. T., Ishizaki, K., Fujisawa, M., Okada, S., Nakayama, S., Fujishita, M., Bando, H., Yodoya, K., Hayashi, K., Banto, T., Hasumi, A., Nishio, T., Sakata, R., Yamamoto, M., Yamaki, A., Kajikawa, M., Yamano, T., Nishide, T., Choi, S.-H., Schimizu-Ueda, Y., Hanajiri, T., Sakaida, M., Kono, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Kuriyama, C., Kohzu, Y., Nishida, H., Brennicke, A., Shin-I, T., Kohara, Y., Kohchi, T., Fukuzawa, H., Ohyama, K. (2007): Gene organization of the liverwort Y chromosome reveals distinct sex chromosome evolution in a haploid system. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 104: 6472-6477.